



(19) RU (11) 2095409 (13) C1

(51) 6 C12N1/20, C12N3/00, A61K39/07,  
C12N1/20, C12R1:07

BEST AVAILABLE COPY

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Российской Федерации

(14) Дата публикации: 1997.11.10

(21) Регистрационный номер заявки: 95111037/13

(22) Дата подачи заявки: 1995.06.27

(46) Дата публикации формулы изобретения:  
1997.11.10

(56) Аналоги изобретения: 1. 1. SU, авторское  
свидетельство, 1837071, кл.С 12N 1/20, 1993. 2.  
SU, авторское свидетельство, 1791449, кл.С  
12N 3/00, 1993.

(71) Имя заявителя: Всероссийский научно-  
исследовательский институт  
ветеринарной вирусологии и  
микробиологии

(72) Имя изобретателя: Гаврилов В.А.; Числов  
Ю.В.; Николайчук Л.Ф.

(73) Имя патентообладателя: Всероссийский  
научно-исследовательский институт  
ветеринарной вирусологии и  
микробиологии

### (54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ЖИВОТНЫХ

Использование: биотехнология, микробиология, вакцина против сибирской язвы животных. Сущность изобретения: культивирование вакцинного штамма 5-ВНИИВВиМ осуществляют в жидкой споруляционно-ростовой среде, содержащей дрожжевой экстракт, пептон, калий фосфорнокислый двузамещенный, кальций хлористый, цинк сернокислый, медь сернокислую, железо сернокислое, аммоний сернокислый и воду (рН 7,2  $\pm$  0,2). При этом культивирование штамма осуществляют в реакторе в течение 23 - 25 ч, из них первые 17 -

19 ч при аэрации, поддерживая скорость растворения кислорода в среде  $5,5 \pm 0,2$  ммоль на 1 л среды в час.

Для концентрирования спор используют натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, которую вносят в суспензию до концентрации 0,2 - 0,3%, а отстаивание осуществляют при температуре 0 - 25°C в течение 23 - 25 ч. 2 з.п. ф-лы.

Изобретение относится к области микробиологии, в частности к биотехнологии вакцинных препаратов, и может быть использовано при изготовлении вакцины против сибирской язвы.

Для изготовления вакцины против сибирской язвы животных используют способ культивирования бактерий вида *B. anthracis* в бутылках-четвертях на плотной питательной споруляционной среде, содержащей в качестве основного компонента гидролизат кормовых дрожжей [1]

Недостатком данного способа является длительность процесса культивирования штамма *B. anthracis* (72 82 ч), а также трудоемкость, так как наработка спорового материала производится в бутылках-четвертях.

Наиболее близким техническим решением, выбранным в качестве прототипа, является способ культивирования штамма 55-ВНИИВВиМ в жидкой питательной среде с использованием в качестве источника азота кислотного гидролизата говяжьего мяса. Способ позволяет за 48 ч получить споровый материал, содержащий 100 300 млн. жизнеспособных спор штамма 55-ВНИИВВиМ [2]

Основные недостатки этого способа заключаются в небольшом выходе спорового материала с 1 см<sup>3</sup> питательной среды (100 300 млн. спор в 1 см<sup>3</sup>), в использовании в среде культивирования мяса, ценного продукта питания человека, а также в длительности процесса выращивания культуры и получения спор (2 сут).

Известен способ концентрирования бактериальных спор отстаиванием с использованием вспомогательного вещества полиэтиленimina (авт.св. N 1792969, кл. С 12 N 1/02, авторы Бакулов И.А и др.). Он позволяет проводить концентрирование бактериальных спор в суспензии за 4-5 сут.

Основные недостатки этого способа заключается в длительности процесса концентрирования (4-5 сут), а также в образовании прочных конгломератов спор при отстаивании, которые трудно ресуспендировать. Наличие конгломератов спор в вакцине недопустимо.

Целью настоящего изобретения является увеличение выхода количества спор с единицы питательной среды, сокращение трудоемкости способа, материальных затрат и времени на получение и концентрирование спорового материала для изготовления вакцины.

Цель достигается тем, что в предлагаемом способе изготовления вакцины против сибирской язвы культивирование осуществляют в реакторе с использованием разработанной нами и апробированной при производстве вакцины жидкой споруляционно-ростовой среды следующего состава (мас.):

Дрожжевой экстракт сухой 0,2-0,3

Пептон ферментативный сухой 0,2-0,3

Калий фосфорнокислый двузамещенный 0,04-0,06

Кальций хлористый 0,004-0,006

Магний сернокислый 0,03-0,05

Цинк сернокислый 0,0005-0,0015

Медь сернокислая 0,0005-0,0015

Железо сернокислое 0,00005-0,00015

Аммоний сернокислый 0,15-0,25

Вода деминерализованная (pH 7,2±0,2) Остальное

Кроме того, используют иные условия культивирования. В первые 18 ч культуру штамма 55-ВНИИВВиМ аэрируют воздухом путем барботирования, уровень аэрации составляет 5,3-5,7 ммоль растворенного кислорода на 1 л среды в 1 ч, при этом 95-100% выросших бактериальных клеток образуют споры. Затем аэрирование прекращают и культуру выдерживают 6 ч до завершения спорообразования и полного лизиса вегетативного материала.

Сокращение времени на концентрирование спорового материала достигается использованием в качестве вспомогательного вещества натриевой соли: карбоксиметилцеллюлозы (Na КМЦ) в оптимальной концентрации 0,2-0,3%. Кроме того, осаждение спор осуществляют непосредственно в реакторе при температуре 0-25°C в течение 23-25 ч.

Способ культивирования разработан на 5-литровом ферментере "Бромма" (фирма ЛКБ Швеция) и воспроизведен в 250-литровом реакторе. Указанный способ может быть осуществлен в сосудах для культивирования различного объема. Для этого необходимо определить массообменные по кислороду характеристики используемых сосудов. Это можно выполнить с помощью сульфитного метода.

Пример 1. Определение массообмена по кислороду в 250-литровом реакторе, выращивание культуры штамма 55-ВНИИВВиМ и получение спор.

В 250-литровом реакторе, содержащем 160 л дистиллированной воды, по усовершенствованному сульфитному методу определяют скорость растворения кислорода (ммоль  $O_2$  в час) при подаче воздуха через барботер в реакторе в количестве 2,5 дм<sup>3</sup>/л воды в мин или 40 дм<sup>3</sup>/160 л воды в мин (1-е измерение); 5 дм<sup>3</sup>/л воды в мин или 80 дм<sup>3</sup>/160 л в мин (2-е измерение) и 7,5 дм<sup>3</sup>/л воды в мин или 120 дм<sup>3</sup>/160 л воды в мин (3-е измерение).

Полученные числовые значения трех измерений используют для построения графика, отражающего зависимость уровня аэрации (ммоль  $O_2$ /л в час) от скорости подачи воздуха в реактор (дм<sup>3</sup>/л в мин).

Выращивание культуры штамма 55-ВНИИВВиМ и получение спор.

В реакторе (250 л) приготавливают 160 л споруляционно-ростовой среды по прописи (см. выше). Реактивы растворяют в той же последовательности, в которой они написаны. Устанавливают рН среды  $7,2 \pm 0,2$  добавлением 25%-ного раствора гидроокиси калия или натрия. Среду стерилизуют при 134°C в течение 1 ч и охлаждают до 30-35°C.

В реактор с питательной средой заливают через пробоотборник посевной материал, споровую суспензию штамма 55-ВНИИВВиМ, в количестве  $1,5 - 3,0 \cdot 10^{12}$  жизнеспособных спор, что составляет  $1,2 \cdot 10^7$  спор на см<sup>3</sup> среды. Весь посевной материал должен содержаться в объеме 2-5 л.

Устанавливают температуру инкубирования 37°C, в засеянную питательную среду подают сжатый воздух через барботер. Скорость подачи воздуха определяют по графику массообмена. Она должна обеспечивать уровень аэрации 5,5 ммоль  $O_2$ /л в час. Культивируют 18 ч. Следующие 6 ч инкубируют без аэрации.

Культура вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ, выращенная в этих условиях, состоит из зрелых жизнеспособных спор, количество которых в 1 см<sup>3</sup> составляет 350-500 млн.

Повышение уровня аэрации выше 5,7 ммоль  $O_2$ /л в час отрицательно влияет на рост и спорообразование культуры штамма 55-ВНИИВВиМ: "урожай" спор с 1 см<sup>3</sup> питательной среды снижается на 30-40% спорообразование происходит лишь у 70-80% выросших вегетативных клеток.

Снижение уровня аэрации ниже 5,3 ммоль  $O_2$ /л в час вызывает резкое уменьшение процента спорообразования. Споруют лишь 50-60% вегетативных клеток. Выход спор с 1 см<sup>3</sup> питательной среды уменьшается на 45-50%.

Пример 2. Осаждение спор в культуре вакцинного сибиреязвенного штамма 55-ВНИИВВиМ непосредственно в реакторе.

В реактор, содержащий 160 л споровой культуры штамма 55-ВНИИВВиМ с концентрацией спор 350-500 млн./см<sup>3</sup>, заливают через пробоотборник 16 л 2%-ного раствора Na КМЦ, простерилизованного при 121°C в течение 1 ч и охлажденного до 40-50°C. Содержимое реактора перемешивают и оставляют в состоянии покоя на 20-24 ч. По истечении этого времени надосадок осторожно декантируют, а осадок тщательно перемешивают и сливают в отдельный сосуд, например 20-литровую стеклянную бутылку. Осадок в количестве 10-15 л содержит 4-6 млрд. жизнеспособных спор/см<sup>3</sup>, легко ресуспендируется и его используют для изготовления вакцины против сибирской язвы животных. В этих условиях происходит 10-15-кратное концентрирование спорового материала.

При добавлении в споровую культуру Na КМЦ в конечной концентрации более 0,2% скорость осаждения спор не увеличивается.

При добавлении в споровую культуру Na КМЦ в количестве 0,10-0,15% осаждение спор происходит медленно в течение 10-12 сут. Изменение температуры от 0 до 25°C не влияет на скорость осаждения спор.

К суперконцентрированному споровому материалу добавляют глицерин до конечной концентрации 30%. Полученную в результате жидкую суперконцентрированную вакцину из штамма 55-ВНИИВВиМ с содержанием 50-300 доз в объеме 1-5 мл разливают в ампулы и отпаивают без вакуума.

Использование предлагаемого способа изготовления вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ по сравнению с существующими способами обеспечивает следующие преимущества:

позволяет изготавливать в реакторах большие объемы спор штамма 55-ВНИИВВиМ и концентрировать их, соблюдая условия стерильности;

сокращает время на изготовление спорового материала в 2 раза, а на концентрирование спор в 5 раз;  
позволяет проводить концентрирование спор в широком диапазоне температуры (0-25°C);  
дает возможность увеличить выход спор с 1 см<sup>3</sup> питательной среды в 2 раза;  
позволяет получать жидкую суперконцентрированную вакцину.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ изготовления вакцины против сибирской язвы животных, включающий культивирование штамма 55-ВНИИВВиМ в жидкой питательной среде, содержащей органический источник азота, до максимального образования спор и концентрирование споровой культуры с использованием вспомогательного вещества с последующим отстаиванием смеси и отделением осадка, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода количества спор с единицы питательной среды, сокращения трудоемкости способа, материальных затрат и времени на получение и концентрирование спорового материала, штамм 55-ВНИИВВиМ культивируют на питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт сухой, пептон, калий фосфорнокислый двузамещенный, кальций хлористый, магний сернокислый, цинк сернокислый, медь сернокислую, железо сернокислое, аммоний сернокислый при следующем соотношении компонентов, мас.

Дрожжевой экстракт сухой 0,2-0,3

Пептон ферментативный сухой 0,2-0,3

Калий фосфорнокислый двузамещенный 0,04-0,06

Кальций хлористый 0,004-0,006

Магний сернокислый 0,03-0,05

Цинк сернокислый 0,0005-0,0015

Медь сернокислая 0,0005-0,0015

Железо сернокислое 0,00005-0,00015

Аммоний сернокислый 0,15-0,25

Вода деминерализованная (рН 7,2 ± 0,2) Остальное

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивирование осуществляют в реакторе в течение 23-25 ч, из них первые 17-19 ч при аэрации, поддерживая скорость растворения кислорода в среде (5,5 ± 0,2) ммоль на 1 л среды в час.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что для концентрирования бактериальных спор в качестве вспомогательного вещества используют натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, которую вносят в суспензию до конечной концентрации 0,2-0,3% а отстаивание проводят при 0-25°C в течение 23-25 ч.

#### ИЗВЕЩЕНИЯ ОБ ИЗМЕНЕНИИ ПРАВОВОГО СТАТУСА

Номер бюллетеня

16/2002

Дата публикации бюллетеня

2002.06.10

Код изменения правового статуса

**ММ4А - Досрочное прекращение действия патентов РФ из-за неуплаты в установленный срок пошлин за поддержание патента в силе**



Russian Agency for  
Patents and Trademarks

(19) RU (11) 2095409 (13) C1

(51) 6 C12N1/20, C12N3/00, A61K39/07,  
C12N1/20, C12R1:07

## (12) INVENTION SPECIFICATION

Pertaining to a Patent of the Russian Federation

- |  |   |
|--|---|
| <p>(14) Publication date: November 10, 1997</p> <p>(21) Registration number of the application: 95111037/13</p> <p>(22) Filing date: June 27, 1995</p> <p>(46) Publication date of patent claims: November 10, 1997</p> <p>(56) Analogs of the invention: 1. I SU Certificate of Authorship 1837071, cl. C 12N 1/20, 1993; 2. SU Certificate of Authorship 1791449, cl. C 12N 3/00, 1993</p> | <p>(71) Name of applicant: All-Russian Scientific Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology</p> <p>(72) Name of inventor: V. A. Gavrilov; Yu. V. Chislov; L. F. Nikolaichuk</p> <p>(73) Name of patent holder: All-Russian Scientific Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology</p> |
|--|---|

### (54) METHOD FOR PRODUCING A VACCINE AGAINST ANIMAL ANTHRAX

Use: biotechnology, microbiology, vaccine against animal anthrax. Essence of the invention: the vaccine strain 5-VNIIVViM is cultured in a liquid sporulation-growth medium containing yeast extract, peptone, potassium biphosphate, potassium chloride, zinc sulfate, copper sulfate, iron sulfate, ammonium sulfate and water (pH 7.2±0.2). Culturing of the strain is accomplished in a reactor over 23 to 25 hours, the first 17 to 19 hours during aeration, maintaining a rate of dissolution of oxygen in the medium of 5.5±0.2 mmol per liter of medium per hour. The sodium salt of carboxymethylcellulose is used to concentrate the spores, the salt being introduced to the suspension to a concentration of 0.2-0.3%, while precipitation is accomplished at a temperature of 0-25°C for 23 to 25 hours. Two dependent claims.

The invention pertains to microbiology, specifically biotechnology of vaccine preparations, and can be used in the production of a vaccine against anthrax.

The method of culturing bacteria of the species *B. anthracis* in quarter bottles on a dense nutrient sporulation medium containing edible yeast hydrolyzate as main component is used to produce the vaccine against anthrax [1].

The shortcoming of this method is the duration of the process for culturing the strain of *B. anthracis* (72 to 82 hours) and also the labor intensity, since workup of the spore material is accomplished in quarter bottles.

The closest technical solution chosen as prior art is the method for culturing the strain 55-VNIIVViM in a liquid nutrient medium using acid hydrolyzate of beef as nitrogen source. The method permits spore material to be produced in 48 hours containing 100 to 300 million vital spores of the strain 55-VNIIVViM [2].

The main drawbacks of this method include the low yield of spore material from 1 cm<sup>3</sup> of nutrient medium (100-300 million spores per 1 cm<sup>3</sup>), use of meat, a valuable human food product, in the culture medium and also the duration of the process for culturing and producing the spores (2 days).

A method is known for concentration of bacterial spores by precipitation, using the auxiliary substance polyethyleneimine (Certificate of Authorship No. 1792969, cl. C 12 N 1/02, authors Bakulov, I. A. et al.). It permits concentration of bacterial spores in the suspension in 4 to 5 days.

The main drawbacks of this method include the duration of the concentration process (4 to 5 days) and also the formation of strong conglomerates of spores during precipitation, which are difficult to resuspend. The presence of spore conglomerates in the vaccine is inadmissible.

The purpose of the present invention is to increase the yield of the number of spores per unit of nutrient medium, reduce the labor intensity of the method, the material costs and time to produce a concentrate spore material for vaccine production.

The objective is achieved in that in the proposed method for producing the vaccine against anthrax culturing is accomplished in a reactor, using a liquid sporulation-growth medium with the following composition (by weight) developed by us and approved in the production of a vaccine:

Dry yeast extract 0.2-0.3  
 Dry enzymatic peptone 0.2-0.3  
 Potassium biphosphate 0.04-0.06  
 Potassium chloride 0.004-0.006  
 Magnesium sulfate 0.03-0.05  
 Zinc sulfate 0.0005-0.0015  
 Copper sulfate 0.0005-0.0015  
 Iron sulfate 0.00005-0.00015  
 Ammonium sulfate 0.15-0.25  
 Demineralized water (pH 7.2±0.2) remainder

Moreover, different culturing conditions are used. In the first 18 hours the culture of strain 55-VNIIVViM is aerated with air by bubbling, the aeration level is 5.3-5.7 mmol of dissolved oxygen per liter of medium in 1 hour, in which 95 to 100% of the grown bacterial cells form spores. Aeration is then stopped and the culture held for 6 hours to completion of spore formation and complete lysis of the vegetative material.

A reduction in the time for concentration of the spore material is achieved by using the sodium salt of carboxymethylcellulose (NaCMC) as auxiliary in an optimal concentration of 0.2-0.3%. Moreover, precipitation of the spores is accomplished directly in the reactor at a temperature of 0 to 25°C over 23 to 25 hours.

The culturing method was worked out on a 5 L "Bromma" fermenter (LKB Co., Sweden) and reproduced in a 250 L reactor. This method can be accomplished in vessels for culturing of different volume. For this purpose it is necessary to determine the mass transfer characteristics of the employed vessels relative to oxygen. This can be done by the sulfite method.

Example 1. Determination of mass transfer relative to oxygen in a 250 L reactor, growing of the culture of strain 55-VNIIVViM and production of spores.

The rate of dissolution of oxygen (mmol O<sub>2</sub> per hour) during supply of oxygen through a bubbler in a reactor in an amount of 2.5 dm<sup>3</sup>/L water per minute or 40 dm<sup>3</sup>/160 L water per minute (first measurement); 5 dm<sup>3</sup>/L of water per minute or 80 dm<sup>3</sup>/160 L per minute (second measurement) and 7.5 dm<sup>3</sup>/L of water per minute or 120 dm<sup>3</sup>/160 L water per minute (third measurement) is determined according to the improved sulfite method in a 250-liter reactor containing 160 L distilled water.

The obtained numerical values of the three measurements are used to plot a graph that reflects the aeration level ( $\text{mmol O}_2/\text{L}$  per hour) versus rate of air feed to the reactor ( $\text{dm}^3/\text{L}$  per minute).

Growing of a culture of strain 55-VNIIVViM and production of spores.

160 L sporulation-growth medium is prepared in a reactor (250 L) according to the specification (see above). The reagents are dissolved in the same sequence in which they are entered. The pH of the medium is set at  $7.2 \pm 0.2$  by adding 25% potassium or sodium hydroxide solution. The medium is sterilized at  $134^\circ\text{C}$  for 1 hour and cooled to  $30\text{--}35^\circ\text{C}$ .

The seed material, a spore suspension of strain 55-VNIIVViM in an amount of  $1.5\text{--}3.0 \cdot 10^{12}$  vital spores, which amounts to 1 to  $2 \cdot 10^7$  spores per  $\text{cm}^3$  of medium is poured into the reactor with nutrient medium through the sampling device. All the seed material should be contained in a volume of 2 to 5 L.

An incubation temperature of  $37^\circ\text{C}$  is established, compressed air is fed into the inoculated nutrient medium. The rate of air feed is determined according to the mass transfer graph. It should ensure an aeration level of  $5.5 \text{ mmol O}_2/\text{L}$  per hour. It is cultured for 18 hours. It is incubated for the next 6 hours without aeration.

The culture of vaccine strain 55-VNIIVViM grown under these conditions consists of mature vital spores, the amount of which is 350 to 500 million in  $1 \text{ cm}^3$ .

An increase in the aeration level above  $5.7 \text{ mmol O}_2/\text{L}$  per hour has an adverse effect on growth and spore formation of the culture of strain of 55-VNIIVViM: "the harvest" of spores from  $1 \text{ cm}^3$  of nutrient medium diminishes by 30 to 40% and spore formation occurs only in 70 to 80% of the grown vegetative cells.

A reduction in the aeration level of  $5.3 \text{ mmol O}_2/\text{L}$  per hour causes a sharp reduction in the percentage of spore formation. Only 50 to 60% of the vegetative cells sporulate. The yield of spores from  $1 \text{ cm}^3$  of nutrient medium diminishes by 45 to 50%.

Example 2. Precipitation of spores in a culture of anthrax vaccine of strain 55-VNIIVViM directly in the reactor.

16 L of a 2% NaCMC solution sterilized at  $121^\circ\text{C}$  for 1 hour and cooled to  $40$  to  $50^\circ\text{C}$  is poured into a reactor through the sampling device, the reactor containing 160 L spore culture of strain 55-VNIIVViM with a spore concentration of 350 to 500 million/ $\text{cm}^3$ . The contents of the reactor are mixed and left at rest for 20 to 24 hours. After this time the supernatant is carefully decanted and the precipitate carefully mixed and poured into a separate vessel, for example a 20-liter glass bottle. The precipitate in an amount of 10 to 15 L contains 4 to 6 billion vital spores/ $\text{cm}^3$ , is easily resuspended and used to produce a vaccine against animal anthrax. Under these conditions 10- to 15-fold concentration of the spore material occurs.

When NaCMC is added to the spore culture in a final concentration of more than 0.2%, the rate of precipitation of the spores is not increased.

When NaCMC is added to the spore culture in an amount of 0.10 to 0.15%, precipitation of the spores occurs slowly over 10 to 12 hours. A change in temperature from 0 to  $25^\circ\text{C}$  does not affect the rate of precipitation of spores.

Glycerol is added to the super concentrated spore material to a final concentration of 30%. The super concentrated liquid vaccine obtained as a result from strain 55-VNIIVViM containing 50 to 300 doses in a volume of 1 to 5 mL is poured into vials and sealed without vacuum.

Use of the proposed method for producing a vaccine from strain 55-VNIIVViM in comparison with the existing methods ensures the following advantages:



It permits production of larger volumes of spores of strain 55-VNIIVViM in reactors and their concentration, observing conditions of sterility;

It reduces the time to produce the spore material by a factor of 2 and the time to concentrate the spores by a factor of 5;

It permits concentration of spores over a wide temperature range (0-25°C);

It offers a possibility of increasing the yield of spores from 1 cm<sup>3</sup> of nutrient medium by a factor of 2;

It permits a liquid super concentrated vaccine to be prepared.

### CLAIMS

1. Method for preparation of a vaccine against animal anthrax, including culturing of strain 55-VNIIVViM in a liquid nutrient medium containing an organic nitrogen source, to maximum spore formation and concentration of the spore culture using an auxiliary substance with subsequent precipitation of the mixture and separation of the precipitate, characterized by the fact that, in order to increase the yield of the number of spores per unit nutrient medium, to reduce the labor intensity of the method, the material costs and time to prepare and concentrate the spore material, strain 55-VNIIVViM is cultured on the nutrient medium containing dry yeast extract, peptone, potassium biphosphate, potassium chloride, magnesium sulfate, zinc sulfate, copper sulfate, iron sulfate, ammonium sulfate with the following ratio of components, by weight,

Dry yeast extract 0.2-0.3  
 Dry enzymatic peptone 0.2-0.3  
 Potassium biphosphate 0.04-0.06  
 Potassium chloride 0.004-0.006  
 Magnesium sulfate 0.03-0.05  
 Zinc sulfate 0.0005-0.0015  
 Copper sulfate 0.0005-0.0015  
 Iron sulfate 0.00005-0.00015  
 Ammonium sulfate 0.15-0.25  
 Demineralized water (pH 7.2±0.2) remainder

2. Method according to Claim 1, characterized by the fact that culturing is accomplished in the reactor for 23 to 25 hours, the first 17 to 19 hours during aeration, maintaining a rate of oxygen dissolution in the medium of (5.5±0.2) mmol per 1 L of medium per hour.

3. Method according to Claim 1, characterized by the fact that, for concentration of the bacterial spores, the sodium salt of carboxymethylcellulose is used as auxiliary substance, introduced to the suspension to a final concentration of 0.2-0.3% and precipitation is carried out at 0 to 25°C over 23 to 25 hours.

### NOTIFICATION OF CHANGE IN LEGAL STATUS

Bulletin number	16/2002
Date of publication of bulletin	June 10, 2002
Code of change in legal status	MM4A – Immediate termination of effect of patents of the Russian Federation owing to nonpayment of the fees to maintain the patent in force in the established period



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**